

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 35 656.4

**Anmeldetag:** 02. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Leica Microsystems Heidelberg GmbH,  
Mannheim/DE

**Bezeichnung:** Verfahren und Anordnung zur Mikroskopie

**IPC:** G 02 B 21/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 4. April 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "deut" followed by a stylized surname.

A small, rectangular official seal or stamp, possibly containing the name of the office or a date, though the text is not clearly legible.

### Verfahren und Anordnung zur Mikroskopie

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Mikroskopie.

Ferner betrifft die Erfindung eine Anordnung zur Mikroskopie, wobei die Anordnung mindesten ein Mikroskopobjektiv, eine Detektoreinheit zum Aufnehmen von Bildern einer Probe, einem Display zum Darstellen der von der Detektoreinheit aufgenommenen Bilder der Probe, und einem Rechnersystem zum Steuern des Mikroskops und der Datenaufnahme umfasst.

In der Mikroskopie bzw. in der Konfokalmikroskopie ist der Benutzer bisher gezwungen selbst die Parameter festzulegen, die zur 3-dimensionalen Erfassung einer Struktur erforderlich sind. Dies ist für einen unerfahrenen Benutzer oftmals sehr schwierig oder kaum möglich, da das hierzu erforderliche Vorstellungsvermögen fehlt. Selbst eine erfahrener Benutzer kann oft Strukturen innerhalb einer Probe anhand optischer Sektionen nicht finden, so dass es zu einen unvollständigen Erfassen der gewünschten Struktur kommt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde ein Verfahren zu schaffen, das die durch weitgehende Automatisierung die Benutzerfreundlichkeit und die Ergonomie eines Mikroskopsystems erhöht und die 3-dimensionale Erfassung von Objekten optimiert.

Die objektive Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das die Merkmale des Patentanspruchs 1 aufweist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde eine Anordnung zu schaffen, die durch weitgehende Automatisierung die Benutzerfreundlichkeit und die Ergonomie eines Mikroskopsystems erhöht und die 3-dimensionale Erfassung von Objekten optimiert.

Diese objektive Aufgabe wird durch eine Anordnung gelöst, die die Merkmale des Patentanspruchs 9 aufweist.

Es ist besonders vorteilhaft, dass ein Mittel zum Bestimmen des interessierenden Bereiches einer Probe vorgesehen ist. Ferner umfasst das

5 Rechnersystem ein Mittel zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum. Die gesamte 3-dimensionale Ausdehnung einer gewählten Struktur kann somit automatisch erfolgen und der Benutzer braucht hierzu nicht unbedingt Kenntnisse über die räumliche Ausdehnung der Struktur und nur ein minimales räumliches

10 Vorstellungsvermögen. Der Benutzer kann die interessierende Struktur z.B. mit einem Fadenkreuz markieren, wobei das Fadenkreuz dem Bild der Probe auf dem Display überlagert ist. Eine andere vorteilhafte Lösung ist, dass das Mittel zum Bestimmen des interessierenden Bereiches ein Mauszeiger ist, mit dem der interessierende Bereich der Probe auf dem Display umfahrbar ist.

15 Das Verfahren ist vorteilhaft, da es ein automatisches Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum, also 3-dimensional, ermöglicht. Das Extrahieren des interessierenden Bereiches einer Probe aus einem Schnittbild erfolgt mittels Bildanalyse und daraus wird eine Liste von Objektpositionen innerhalb des Schnittbildes aufbaut. Anschließend wird eine Liste von

20 möglichen weiteren Objektpositionen ausserhalb des Schnittbildes definiert. Diese wird suzessive getestet indem die möglichen Objektpositionen vom Mikroskop angefahren, aufgenommen und auf Objektzugehörigkeit getestet werden. Hierzu erfolgt sequentiell die Selektion einer Teilliste der möglichen weiteren Objektpositionen, die vom Mikroskop parallel aufgenommen werden

25 können. Zu dieser Liste erfolgt das Anfahren einer Mikroskopposition, die die Aufnahme einer Szene ermöglicht, in der alle möglichen Objektpositionen der Teilliste sichtbar sind. Nach dem Durchführen einer Datenaufnahme erfolgt der Abgleich der Teilliste der möglichen Objektpositionen mit den aufgenommenen Daten und folglich die Elimination aller nicht zum Objekt

30 gehörenden möglichen Objektpositionen und das Speichern der zum Objekt gehörenden Objektpositionen und Intensitätswerte.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung können den Unteransprüchen entnommen werden.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

5      Fig. 1      eine schematische Darstellung eines Scanmikroskops;

Fig. 2      eine erste Variante der Auswahl einer gewünschten Struktur auf einem Display;

Fig. 3      eine zweite Variante der Auswahl einer gewünschten Struktur auf einem Display;

10     Fig. 4      eine schematische Darstellung 3-dimensionale Darstellung der gewünschten Struktur in einem Probenvolumen;

Fig. 5a      eine graphische Darstellung einer ersten Ebene, die die gewünschte Struktur schneidet,

Fig. 5b      eine graphische Darstellung einer zweiten Ebene, die die gewünschte Struktur schneidet;

15     Fig. 5c      eine graphische Darstellung einer dritten Ebene, die die gewünschte Struktur schneidet; und

Fig. 5d      eine graphische Darstellung einer vierten Ebene, die die gewünschte Struktur schneidet.

20     In Fig. 1 ist das Ausführungsbeispiel eines konfokalen Scanmikroskops 100 schematisch gezeigt. Dies soll jedoch nicht als Beschränkung der Erfindung aufgefasst werden. Es ist dem Fachmann hinlänglich klar, dass die Erfindung auch mit einem konventionellen Mikroskopsystem realisiert werden kann. Der von mindestens einem Beleuchtungssystem 1 kommende

25     Beleuchtungslichtstrahl 3 wird von einem Strahlteiler oder einem geeigneten Umlenkmittel 5 zu einem Scanmodul 7 geleitet. Bevor der Beleuchtungslichtstrahl 3 auf das Umlenkmittel 5 trifft, passiert dieser ein Beleuchtungspinhole 6. Das Scanmodul 7 umfasst einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 9, der den Beleuchtungslichtstrahl 3 durch eine

30     Scanoptik 12 und ein Mikroskopobjektiv 13 hindurch über bzw. durch ein

Probe 15 führt. Der Beleuchtungslichtstrahl 3 wird bei nicht transparenten Objekten 15 über die Objektoberfläche geführt. Bei biologischen Proben 15 (Präparaten) oder transparenten Objekten kann der Beleuchtungslichtstrahl 3 auch durch das Probe 15 geführt werden. Zu diesen Zwecken werden 5 nichtleuchtende Präparate ggf. mit einem geeigneten Farbstoff präpariert (nicht dargestellt, da etablierter Stand der Technik). Die in dem Objekt vorhandenen Farbstoffe werden durch den Beleuchtungslichtstrahl 3 angeregt und senden Licht in einem ihnen eigenen charakteristischen Bereich des Spektrums aus. Dieses von der Probe 15 ausgehende Licht definiert einen 10 Detektionslichtstrahl 17. Dieser gelangt durch die Mikroskopobjektiv 13, die Scanoptik 12 und über das Scanmodul 7 zum Umlenkmittel 5, passiert dieses und gelangt über ein Detektionspinhole 18 auf mindestens einer Detektoreinheit 19, der als Photomultiplier ausgeführt ist. Es ist dem Fachmann klar, dass auch andere Detektionskomponenten, wie z.B. Diode, 15 Diodenarrays, Photomultiplierarrays, CCD Chips oder CMOS Bildsensoren eingesetzt werden können. Der von der Probe 15 ausgehende bzw. definierte Detektionslichtstrahl 17 ist in Fig. 1 als gestrichelte Linie dargestellt. Im Detektor 19 werden elektrische, zur Leistung des vom Objekt 15 ausgehenden Lichtes, proportionale Detektionssignale erzeugt. Da, wie bereits oben 20 erwähnt, von der Probe 15 Licht nicht nur einer Wellenlänge ausgesandt wird, ist es sinnvoll vor der mindestens einen Detektoreinheit 19 ein Selektionsmittel 21 für das von der Probe 15 ausgehende Spektrum einzufügen. Die von der Detektoreinheit 19 erzeugten Daten werden an ein Rechnersystem 23 weitergegeben. Dem Rechnersystem 23 ist mindestens ein Peripheriegerät 27 25 zugeordnet. Ein Peripheriegerät ist als Display 32 ausgebildet, auf dem der Benutzer Hinweise zur Einstellung des Scanmikroskops erhält, den aktuellen Setup und auch die Bilddaten in graphischer Form entnehmen kann. Ferner ist mit dem Rechnersystem 23 ein Eingabemittel zugeordnet, das z.B. aus einer Tastatur 28, einer Einstellvorrichtung 29 für die Komponenten des 30 Mikroskopsystems und einer Maus 30 besteht.

In Fig. 2 ist das Display 32 mit einem auf dem Display 32 wiedergegebenen strukturierten Abbildung 33 des Objekts 15 dargestellt. Die strukturierte Abbildung 33 der Probe 15 repräsentierte eine Ebene in der Probe 15, auf die

gerade das Mikroskopobjektiv 13 fokussiert ist. Der Benutzer wählt im kontinuierlichen Scanbetrieb z.B. diese eine Ebene, die ihm die gewünschte Struktur 34 zeigt. Zum Auffinden der gewünschten Struktur 34 helfen dem Benutzer ggf. Autofokus und Autogain Einstellungen, die das

5 Mikroskopsystem per se vorweist. Zum Zielen auf die gewünschten Struktur 34 ist im Display 32 ein Fadenkreuz 35 überlagert. Somit kann der Benutzer aus der strukturierten Abbildung 33 der Probe 15 das erste Bild gewinnen, das die gewünschten Struktur 34 enthält. Das Rechnersystem umfasst ein Mittel 25 zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches.

10 Das Mittel 25 zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum in Form von Hardware und Software ausgestaltet sein. In einer weiteren Ausführungsform ist das Mittel 25 zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum in Form eines Softwaremoduls realisiert.

15 In Fig. 3 ist ein anderes Ausführungsbeispiel zum Auswählen einer gewünschten Struktur 34 dargestellt. Der Benutzer wählt im kontinuierlichen Scanbetrieb z.B. diese eine Ebene, die ihm die gewünschte Struktur 34 zeigt. Zum Markieren der gewünschten Struktur 34 kann der Benutzer um die gewünschten Struktur 34 eine 36 zeichnen. Das Zeichnen oder ziehen der

20 geschlossenen Linie 36 kann z.B. mit der Maus oder einem dafür vorgesehenen Joystick erfolgen. Wird die Maus zum Zeichnen verwendet so kann einem Mauszeiger 37 über einen Klick-Button auf dem Display 32 eine Zeichenfunktion zugewiesen werden.

Wie bereits in der Beschreibung zu den Fign. 2 und 3 dargelegt, wird die

25 gewünschte Struktur 34 bzw. der interessierende Bereich der Probe vom Benutzer ausgewählt. Das Mikroskopsystem führt dann ein automatisches Erfassen der gesamten markierten Probenbereiches im Raum durch, d.h. dass die ausgewählte Struktur, und nur diese, in allen drei Raumrichtungen x, y und z erfasst wird. In Fig. 4 ist die gewünschte und vom Benutzer

30 ausgewählte Struktur 34 in einem umschließenden Probenvolumen 40 dargestellt. Das Probenvolumen 40 und somit auch die ausgewählte Struktur 34 wird durch mehrere, gleich beabstandete Ebenen 42<sub>1</sub>, 42<sub>2</sub>, 42<sub>3</sub> und 42<sub>4</sub> geschnitten. Die Ebenen 42<sub>1</sub>, 42<sub>2</sub>, 42<sub>3</sub> und 42<sub>4</sub> sind dabei zur xy-Ebene 41 des

Probenvolumens 40 parallel. Der Benutzer wählt eine Ebene innerhalb des Probenvolumens 40 aus. Die ausgewählte Ebene entspricht der Ebene auf die da Mikroskopsystem fokussiert und die auf dem Display 32 dargestellt interessierenden Bereiches der Probe enthält. Das Extrahieren des 5 interessierenden Bereiches bzw. des ausgewählten Struktur einer Probe erfolgt mittels Bildanalyse. Es wird eine Liste aufgebaut die Objektpositionen enthält. Die Objektpositionen sind durch die x-y Koordinaten im Bildframe bestimmt. Die Lage der Ebenen bzw. deren Beabstandung ergibt sich aus der optimalen z-Auflösung des gerade verwendeten Mikroskopobjektivs 13. Durch 10 eine entsprechende Kodierung an den verwendbaren Objektiven kann das Rechnersystem 23 des Mikroskopsystems automatisch die Berechnung der optimalen z-Auflösung des Mikroskopobjektivs 13 durchführen. Das Anfahren Mikroskopposition, die die Aufnahme einer Szene ermöglicht wird durch Mittel zum Anfahren 7, 38, 39 der Mikroskopposition erreicht. Das Mittel zum 15 Anfahren einer möglichen Mikroskopposition ist durch eine Verstelleinrichtung 38 für das Mikroskopobjektiv 13 in z-Richtung und einer Verstelleinrichtung 39 für den Mikroskopisch in der xy-Ebene ermöglicht. Bei einem Scanmikroskop ist das Mittel zum Anfahren einer möglichen Mikroskopposition ist durch eine Verstelleinrichtung 38 für das Mikroskopobjektiv 13 in z-Richtung und das 20 Scanmodul 7 realisiert, das die Probe 15 in der xy-Ebene abscannt. Eine Kombination aus dem Scanmodul 7, der Verstelleinrichtung 38 für das Mikroskopobjektiv 13 und der Verstelleinrichtung 39 für den Mikroskopisch ist ebenfalls denkbar zum anfahren einer gewünschten Mikroskopposition.

In den Fign. 5a bis 5d sind die einzelnen Ebenen 42<sub>1</sub>, 42<sub>2</sub>, 42<sub>3</sub> und 42<sub>4</sub> aus Fig. 25 4 in der Draufsicht dargestellt. Die Ebenen 42<sub>1</sub>, 42<sub>2</sub>, 42<sub>3</sub> und 42<sub>4</sub> in mehrere gleich große Pixel 45 unterteilt. Die Pixel 45 haben eine endliche Ausdehnung und stehen für die Größe der aufeinander folgenden Abtastbereiche. In den Fign. 5a bis 5d sind die Pixel 45 2-dimensional dargestellt. Es ist jedoch selbstverständlich, dass die Pixel auch als 3-dimensionale Voxel sein können. 30 Der Benutzer hat vielleicht auf die dritte Ebene 42<sub>3</sub> scharf gestellt, so dass in dieser Ebene zunächst eine mögliche Objektposition 50 durch eine geeignete Bildverarbeitung gefunden wird. Ausgehend von der möglichen Objektposition 50 werden weitere Objektpositionen 51 in der nächsten Nachbarschaft um die

mögliche Objektposition gesucht. Dabei beschränkt sich die Suche zunächst noch auf die ausgewählte Ebene 42<sub>3</sub>. Aus der Suche wird eine Liste von möglichen weiteren Objektpositionen erzeugt. Diese weiteren Objektpositionen 51 werden nur dann mit dem Bezugszeichen 51 bezeichnet, 5 wenn die weitere Objektposition 51 innerhalb eines Pixels zumindest noch ein Teil der gewählten Struktur zu finden ist. Ausgehend von den weiteren Objektpositionen 51 verfährt man in entsprechender Weise weiter und erzeugt zusätzliche Objektpositionen 52, die ebenfalls zumindest noch einen der gewünschten Struktur enthalten. Bezüglich der Bezeichnung mit dem 10 Bezugszeichen 52 gilt das gleiche wie bei den mit 51 bezeichneten Objektpositionen. Ausgehend von den Objektpositionen 52 werden Objektpositionen 53 gesucht. Man fährt so lange damit fort, bis man in der ausgewählten Ebene 42<sub>3</sub> keine Pixel mehr finden kann, die zumindest ein Teil der gewählten Struktur enthalten. Die Gesamtheit der Objektpositionen die 15 einen Teil der gewählten Struktur 34 enthalten, werden in eine Teilliste von Objektpositionen eingetragen, die vom Mikroskop parallel aufgenommen werden können. Dabei wird beim Erstellen der Teilliste darauf geachtet, dass keine Doppelzählung der Pixel mit einer gewünschten Struktur 34 erfolgt. Schließlich kommt es zum Anfahren einer Mikroskopposition, die die 20 Aufnahme einer Szene ermöglicht, in der alle möglichen Objektpositionen der Teilliste sichtbar sind. Die Datenaufnahme in der ausgewählten Ebene 42<sub>3</sub> wird durchgeführt.

Wie bereits in Fig. 4 schematisch dargestellt, erstreckt sich die gewünschte Struktur 34 neben der bereits untersuchten Ebenen 42<sub>3</sub> aus auf die Ebenen 25 42<sub>1</sub>, und 42<sub>2</sub>. In der Ebene 42<sub>4</sub> findet das Verfahren keine Pixel, in denen zumindest ein Teil der gewünschten Objektpositionen zu finden ist. An Hand der in der Ebene 42<sub>3</sub> gefundenen Objektpositionen 50, 51, 52, und 53 erfolgt ein Erweitern der Liste von möglichen Objektpositionen in den Ebenen 42<sub>1</sub>, und 42<sub>2</sub>. Ausgehend von der Objektposition sucht das Verfahren bzw. 30 Mikroskopsystem in der Ebene 42<sub>4</sub> nach weiteren möglichen Objektpositionen. Da die Ebene 42<sub>4</sub> (Fig. 5d) keine weiteren möglichen Objektpositionen enthält ist hier lediglich die mögliche Objektposition 60 bezeichnet, die der Objektposition 50 aus Ebene 42<sub>3</sub> gegenüberliegt. Die Such nach möglichen

Objektpositionen kann in dieser Ebene abgebrochen werden, da keine weiteren Objektpositionen gefunden werden, die die gewünschte Struktur 34 enthalten.

Erstreckt man die Suche auch die über der Ebene  $42_3$  liegende Ebene  $42_2$ , so

5 wählt man ein Pixel mit der Objektposition 70, das der Objektposition 50 aus der Ebene  $42_3$  entspricht. Da hier ein Pixel gefunden wird, das zumindest einen Teil der gewünschten Struktur 34 enthält, wird für dieses Pixel die Ziffer 70 eingetragen. Wie bereits oben beschrieben erfolgt die Suche nach möglichen weiteren Objektpositionen, in dem man ausgehend von der

10 möglichen Objektposition 70 die nächsten Nachbarn untersucht. Dadurch erzielt man in der Ebene  $42_2$  weitere Objektpositionen 71, 72, 73, und 74, die einen Teil der gewünschten Struktur 34 enthalten. Dabei wird bei der Suchen nach den nächsten Nachbarn, die zumindest einen Teil der gewünschten Struktur enthalten darauf geachtet, dass es zu keinen Doppelzählungen

15 kommt, d.h. keine Objektpositionen in die Liste aufgenommen werden, die bereits vorher in der Ebene als eine Objektposition bestimmt worden sind.

Ausgehend von der Ebene  $42_2$ , wählt man das Pixel mit der Objektposition 70 und erstreicht von hier aus die Suche in der Ebene  $42_1$ . Als Startpunkt einer möglichen Objektposition 80 wählt man diese Pixel. Ausgehend von der

20 Objektposition 80 ermittelt man die weiteren möglichen Objektpositionen 81, 82 und 83.

Es ist bei der Suche nach den möglichen Objektpositionen selbstverständlich, dass das Verfahren oder das Mikroskopsystem bei einer gefundenen Objektposition in einer Ebene auch die Objektpositionen untersucht, die dieser

25 Ebene unmittelbar benachbart sind.

Der in diesen Darstellungen implizit vorhandene Test ob ein Pixel zu einer Objektstruktur gehört oder nicht kann eine ganze Klasse von Funktionen aus dem Bereich der Bildverarbeitung darstellen. In der einfachsten Ausprägung wird eine Klassenbildung über die aufgenommene Intensität des Messpunktes erstellt. Sobald der aufgenommene Wert größer als ein Schwellwert  $T$  ist wird der Pixel als zum Objekt gehörend betrachtet, ansonsten verworfen. Diese einfachste Entscheidung ist für Anwendungen

in der Fluoreszenzmikroskopie schon hinreichend. In einer vorteilhaften Ausprägung der Erfindung wird dieser Schwellwert vom Benutzer definiert. In einer noch vorteilhafteren Ausprägung wird das Startbild auf Multimodalität geprüft und anhand der Werte ein oberer und ein unterer Schwellwert definiert. Computergestützte Verfahren die dies leisten sind zum Beispiel das Verfahren von Otso oder rekursiv arbeitende Entropiemaximierung für Grauwertbilder. In der Literatur (z.B. Duda, Hart, Patter Classification, Wiley) über Mustererkennung sind weitere Mechanismen bekannt die ähnliches bewirken und werden als Stand der Technik benannt und als austauschbar angesehen.

Eine noch vorteilhaftere Ausprägung adaptiert über die Datenaufnahme die Wahl des Schwellwerts, wobei im wesentlichen die oben beschriebenen Methoden über benachbarte bereits aufgenommene Testpositionen ausgeführt werden und im Vergleich zum initialen Wert bewertet werden.

15 Für nicht Fluoreszenzmikroskopie ist es ggf. vorteilhaft eine Datenvorverarbeitung über die Intensitäten der Testpositionen auszuführen, um mittels oben beschriebener Verfahren eine ideale Trennung zu erzielen. Die Art der Vorverarbeitung hängt stark von der Bildmodalität und verwendeten Kontrastierverfahren ab.

20 Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

**Bezugszeichenliste:**

1	Beleuchtungssystem
3	Beleuchtungslichtstrahl
5	Umlenkmittel
5	6 Beleuchtungspinhole
	7 Scanmodul
	9 Scanspiegel
	12 Scanoptik
	13 Mikroskopobjektivs
10	15 Probe
	17 Detektionslichtstrahl
	18 Detektionspinhole
	19 Detektoreinheit
	20 SP Modul
15	21 Selektionsmittel
	23 Rechnersystem
	25 Mittel zum automatisch Erfassen
	26 Speicher
	27 Peripheriegerät
20	28 Tastatur
	29 Einstellvorrichtung
	30 Maus
	31
	32 Display
25	33 strukturierte Abbildung

- 34 ausgewählte Struktur
- 35 Fadenkreuz
- 36 Linie
- 37 Mauszeiger
- 5 38 Verstelleinrichtung für Mikroskopobjektiv
- 39 Verstelleinrichtung für Mikroskopisch
- 40 Probenvolumen
- 41 xy-Ebene
- 42<sub>1</sub>, 42<sub>2</sub>, 42<sub>3</sub> und 42<sub>4</sub> gleich beabstandete Ebenen
- 10 50 mögliche Objektposition
- 51 weitere Objektposition
- 52 weitere Objektposition
- 53 weitere Objektposition
- 60 Objektpositionen
- 15 70 Objektpositionen
- 71 Objektpositionen
- 72 Objektpositionen
- 73 Objektpositionen
- 74 Objektpositionen
- 20 80 Objektpositionen
- 81 Objektpositionen
- 82 Objektpositionen
- 83 Objektpositionen
- 100 Mikroskopsystem

Patentansprüche

1. Verfahren zur Mikroskopie gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - a) Aufnehmen eines Bildes und Bestimmen eines interessierenden Bereiches einer Probe (15) innerhalb des Bildes und
  - 5 b) Automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum.
2. Verfahren zur Mikroskopie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Benutzer eine Ebene innerhalb der Probe (15) wählt, die den interessierenden Bereich der Probe enthält.
- 10 3. Verfahren zur Mikroskopie nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Auswählen des interessierenden Bereiches der Probe (15) mit einem Fadenkreuz (35) erfolgt, das dem Bild von der Probe auf einem Display (32) überlagert wird.
- 15 4. Verfahren zur Mikroskopie nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Auswählen des interessierenden Bereiches der Probe (15) durch Umfahren des interessierenden Bereiches der Probe im Bild der auf einem Display (32) dargestellten Probe (15) erfolgt.
5. Verfahren zur Mikroskopie nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch
- 20 die folgenden Schritte:
  - a) Extrahieren des interessierenden Bereiches einer Probe (15) mittels Bildanalyse und Aufbau einer Liste von Objektpositionen;
  - b) Definition einer Liste von möglichen weiteren Objektpositionen abgeleitet aus den Nachbarschaften der Liste von Objektpositionen;

5           c) Selektion einer Teilliste der möglichen weiteren Objektpositionen, die vom Mikroskop parallel aufgenommen werden können;

10           d) Anfahren einer Mikroskopposition, die die Aufnahme einer Szene ermöglicht, in der alle möglichen Objektpositionen der Teilliste sichtbar sind;

15           e) Durchführen einer Datenaufnahme;

20           f) Abgleich der Teilliste der möglichen Objektpositionen mit den aufgenommenen Daten, Elimination aller nicht zum Objekt gehörenden möglichen Objektpositionen und Speichern der zum Objekt gehörenden Objektpositionen;

25           g) Erweitern der Liste von möglichen weiteren Objektpositionen an Hand der in f) gefundenen zum Objekt gehörenden Objektpositionen;

30           h) Wiederholen der Schritte von d bis g solange die Liste von möglichen weiteren Objektpositionen Elemente enthält.

6.           Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Liste von Objektpositionen als x-y-z Koordinaten mit Bezug auf das Voxelraster darstellbar sind.

7.           Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es die weiteren Schritte umfasst:

20           a) Generierung einer neuen Teil-Liste von Testpositionen anhand der gefundenen Objektpositionen.

25           b) Aufnahme der Teil-Liste in die Liste aller hypothetischen Testpositionen unter Ausschluss doppelter Einträge und bereits angefahrener Positionen.

30           8.           Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren zur Mikroskopie bei einem Scanmikroskop angewendet wird.

9. Anordnung zur Mikroskopie mit einem Mikroskop, mit mindestens einem Mikroskopobjektiv (13), einer Detektoreinheit (19) zum Aufnehmen von Bildern einer Probe, einem Display (32) zum Darstellen der von der Detektoreinheit (19) aufgenommenen Bilder der Probe, und einem Rechnersystem (23) steuern des Mikroskops (100) und der Datenaufnahme, dadurch gekennzeichnet, dass ein Mittel zum Bestimmen des interessierenden Bereiches der Probe (15) vorgesehen ist und in Rechnersystem (23) ein Mittel (25) zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum.

10 10. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel (25) zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum ein Softwaremodul ist.

11. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel (25) zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum in Form von Hardware und Software ausgestaltet ist.

12. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Bestimmen des interessierenden Bereiches ein Fadenkreuz (35) umfasst, wobei das Fadenkreuz (35) dem Bild der Probe (15) auf dem Display (32) überlagert ist.

13. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Bestimmen des interessierenden Bereiches einen Mauszeiger (37) umfasst, mit dem der interessierende Bereich der Probe auf dem Display (32) umfahrbar ist.

14. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Rechnersystem (23) Mittel zum Extrahieren des interessierenden Bereiches einer Probe (15) mittels Bildanalyse und zum Aufbau einer Liste von Objektpositionen, Mittel zur Definition einer Liste von möglichen weiteren Objektpositionen, Mittel zur Selektion einer Teilliste der möglichen weiteren Objektpositionen, die vom Mikroskop parallel aufgenommen sind, Mittel zum Anfahren (7, 38, 39) einer Mikroskopposition, die die Aufnahme einer Szene ermöglicht, in der alle möglichen Objektpositionen der Teilliste sichtbar sind und Mittel zum Abgleich der Teilliste der möglichen Objektpositionen mit den

aufgenommenen Daten, und Mittel zur Elimination aller nicht zum Objekt gehörenden möglichen Objektpositionen und einem Speicher (26), der die zur Probe (15) gehörenden Objektpositionen speichert, umfasst.

15. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das  
5 Mikroskop ein Scanmikroskop ist.

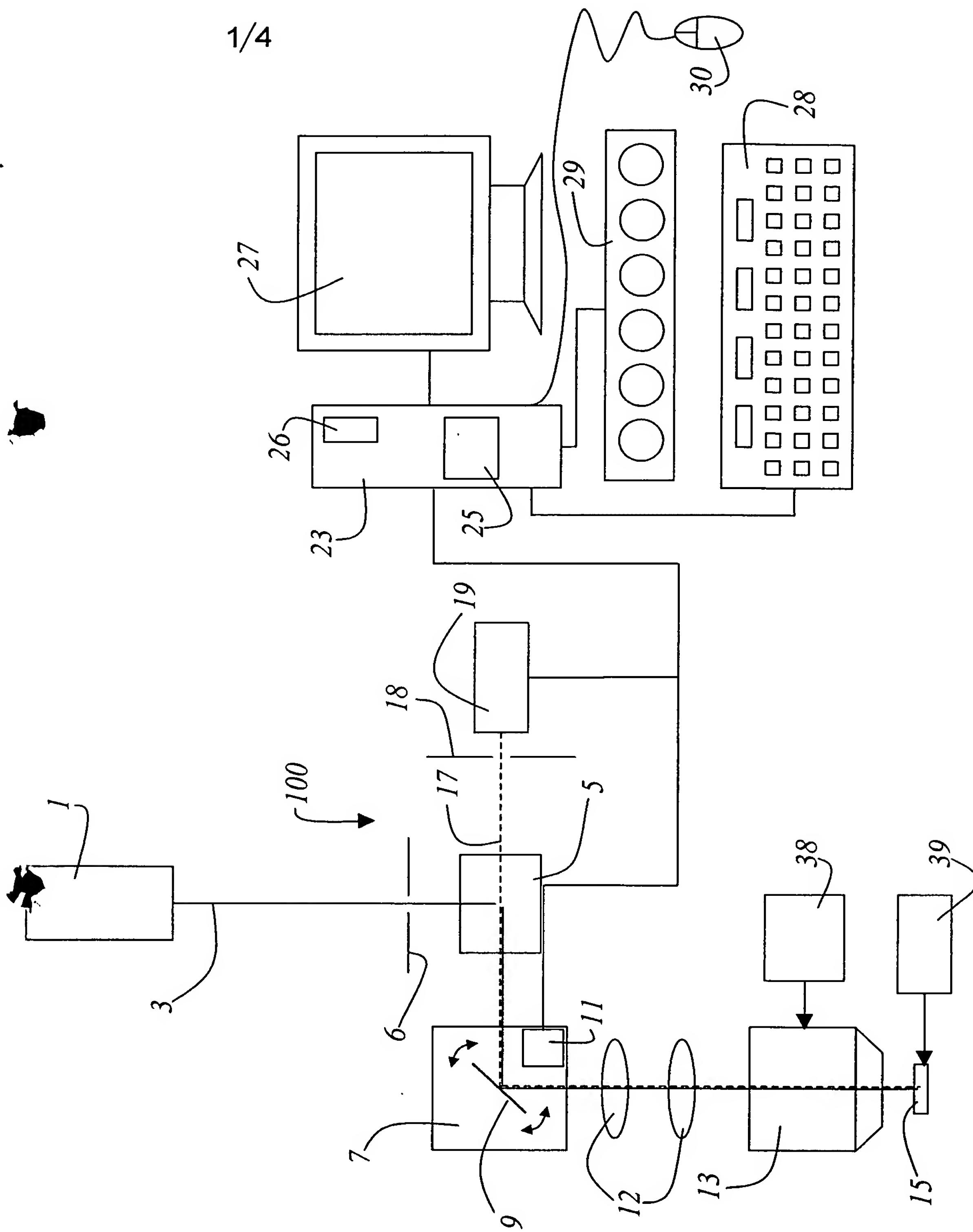
Zusammenfassung

Es ist ein Verfahren und eine Anordnung zu automatisch, 3-dimensionalen Erfassung von interessierenden Strukturen in einer Probe (15). Die Anordnung besitzt ein Mikroskop mit mindestens einem Mikroskopobjektiv (13). Mit einer 5 Detektoreinheit (19) werden die Bilder von einer Probe (15) aufgenommen. Ein Rechnersystem (23) steuert die Aufnahme der Bilder und die Mikroskopfunktionen. Das Rechnersystem (23) besitzt ein Mittel (25) zum automatischen Erfassen des gesamten markierten Probenbereiches im Raum.

10

Fig. 1

**Fig. 1**



2/4

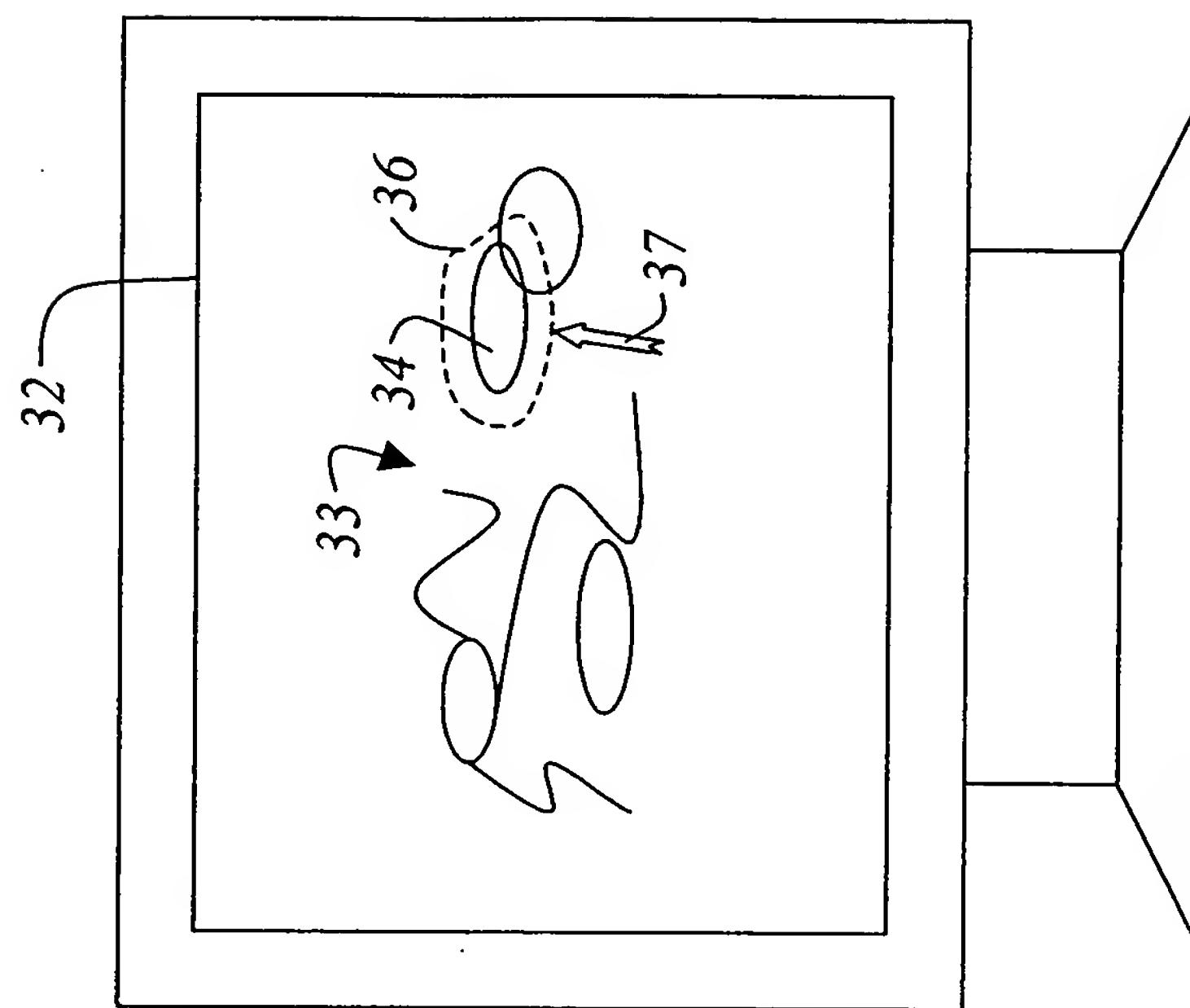


Fig. 3

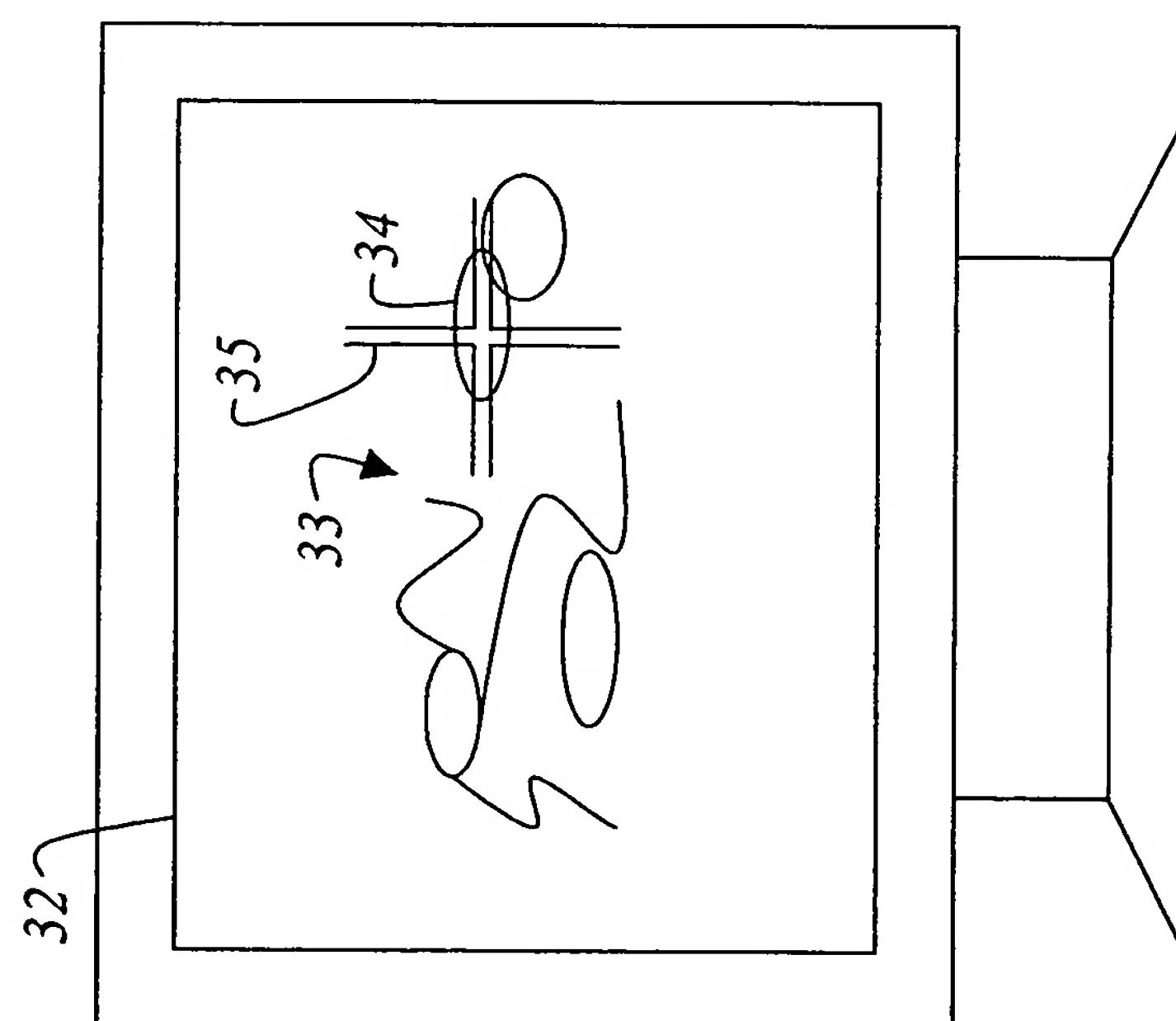


Fig. 2

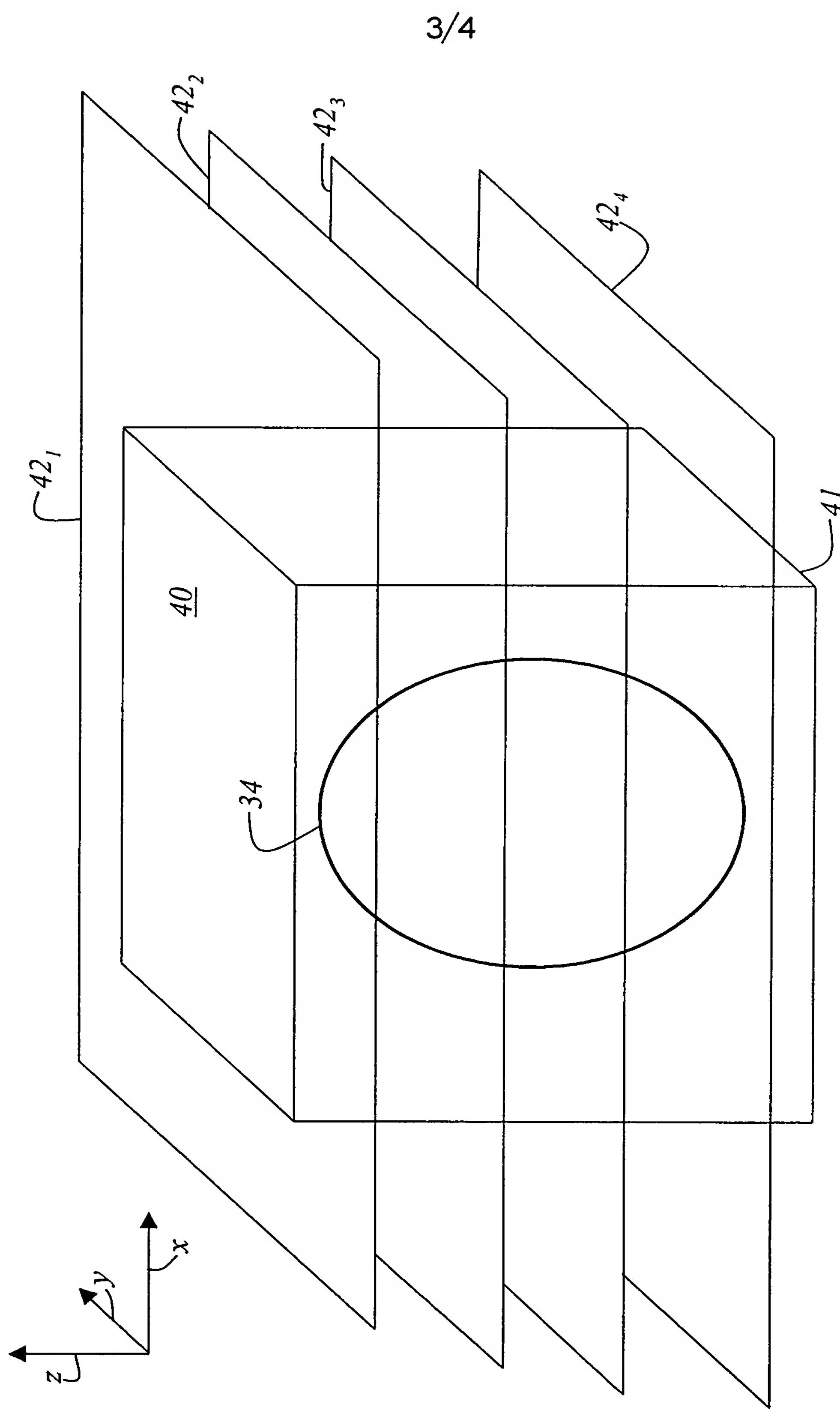


Fig. 4

42<sub>1</sub>

81	82	83					
80	81	82					
81	82	83					

**Fig. 5a**

42<sub>2</sub>

72	73	74					
72	71	72	73	74			
71	70	71	72	73			
72	71	72	73	74			

**Fig. 5b**

4/4

42<sub>3</sub>

53							
51	52	53					
51	50	51	52	53			
51	52	53					

**Fig. 5c**

42<sub>4</sub>


**Fig. 5d**